

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Aleksandra Mrkalj

Diplomski studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**ANALIZA GENETSKE VARIJABILNOSTI CRNE SLAVONSKE
SVINJE**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI

Aleksandra Mrkalj

Diplomski studij Zootehnika

Smjer Specijalna zootehnika

**ANALIZA GENETSKE VARIJABILNOSTI CRNE SLAVONSKE
SVINJE**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Vladimir Margeta, predsjednik
2. dr.sc. Kristina Gvozdanović, mentor
3. izv.prof.dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, član

Osijek, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1.2. Proizvodna svojstva crne slavonske svinje	4
2.1.3. Tipovi uzgoja svinja na otvorenom.....	5
2.1.3.1. Silvo pastoralni tip uzgoja svinja.....	5
2.1.3.2. Dehesa sustav	6
2.1.3.3. Montado sustav.....	6
2.1.4. Načini držanja crne slavonske svinje	6
2.2. Genetska identifikacija autohtonih pasmina svinja	9
2.2.1. Molekularni markeri- mikrosateliti	9
2.2.2. Mitohondrijska DNA.....	10
2.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida	11
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Eksperimentalne životinje.....	15
3.2. Analiza DNK	15
3.3. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa	15
3.4. Statistička obrada podataka	17
4. REZULTATI	18
4.1. Genetska varijabilnost unutar populacije.....	18
4.2. Genetska struktura populacije.....	23
5. RASPRAVA.....	27
6. ZAKLJUČAK.....	30
7. POPIS LITERATURE.....	31
8. SAŽETAK.....	36
9. SUMMARY	37
10. POPIS TABLICA.....	38
11. POPIS SLIKA	39
12. POPIS GRAFIKONA.....	40
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	41
BASIC DOCUMENTATION CARD	42

1.UVOD

Crna slavonska svinja vrlo je cijenjena pasmina svinja, a gotovo i jedina pasmina u Slavoniji. Prema pretpostavkama Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (engl. Food and Agriculture Organisation, FAO), ugroženo je više od 30% pasmina domaćih životinja, a najviše u razvijenim dijelovima svijeta, gdje visoko proizvodne pasmine potiskuju autohtone (Brkić i sur., 2014.). Uzrok tome je povećanje proizvodnosti, intenzivno pristupanje stočarstvu te pretapanje populacija jedna u drugu. U drugoj polovici 20. stoljeća došlo je do nepovratnog gubitka i neprocjenjivog osiromašenja područja u kojemu su obitavale autohtone pasmine zbog želje za napretkom i ekonomskoj dobiti. Svaka pasmina ima svoju jedinstvenu i neponovljivu kombinaciju gena u kojoj su sakupljena brojna stoljeća borbe sa prirodnim uvjetima, kao i usmjeren selekcijski rad (Ivanković, 2005.). Razvitkom svinjogojstva, crna slavonska pasmina svinja je zaboravljena i potisnuta dok je nekad bila nezaobilazna pasmina u torovima i na pašnjacima slavonske ravnice. Očuvanje crne slavonske svinje kao i unapređenje njenih reproduktivnih i proizvodnih svojstava omogućilo bi povećanje konkurentnosti OPG-a, ostanak ljudi na selu i razvoj hrvatskog svinjogojstva koje zadnjih desetljeća bilježi zabrinjavajući pad. Zbog smanjivanja genetske varijabilnosti, slabljenja konstitucije svinja i kvalitete njihova mesa očuvanje autohtonih pasmina čini se vrlo nužnim (Senčić i sur., 2001.). Uslijed intenziviranja stočarske proizvodnje i stroge selekcije na plodnost, prirast i konverziju hrane, nepovratno su izgubljena svojstva otpornosti, dugovječnosti, mirnog temperamenta te iskorištavanja hrane iz prirode. Crna slavonska svinja jedina je naša izvorna pasmina svinja stvorena planskim križanjem, s ciljem unaprjeđenja rasta i razvitka, plodnosti, otpornosti te kakvoće mesa (Horvath, 1996.; Posavi i sur., 2003.; 2004.; Uremović, 2004.; Barać i sur., 2011.; HPA, 2013.). Unazad nekoliko godina selekcija svinja bila je zasnovana na fenotipskom očuvanju pojedinih obilježja životinje, odnosno njezinih daljnjih i bližih srodnika. Razvojem znanosti i tehnologije, tijekom zadnjih dvadesetak godina počele su se koristiti molekularno-genetske metode u selekciji svinja (Ivanković, 2005.; Kabalin i sur., 2008.). Cilj ovog rada bio je utvrditi i analizirati genetsku varijabilnost 50 uzoraka crne slavonske pasmine svinja na temelju molekularno-genetskih analiza.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Crna slavonska svinja

2.1.1. Podrijetlo i nastanak crne slavonske svinje

Imanje Karla i Leopolda Pfeiffera u blizini Osijeka poznato je po nastanku Crne slavonske pasmine svinja. Kombinacijskim križanjem lasaste mangulice s pasminama berkšir i povremenim ubacivanjem krvi polad kine krajem prošlog i početkom ovoga stoljeća stvorena je domaća autohtona pasmina. Nastanak crne slavonske svinje vezan je uz potrebu grofa Pfeiffera da se stvori svinja koja će biti plodnija, ranozrelija i s većim prinosom mesa. Unatoč oštroj selekcijom i stvaranjem pasmine dobrih proizvodnih svojstava bilo je nužno zadržati prilagodljivost lošijim proizvodnim uvjetima seoskih gospodarstava (Karolyi i sur., 2010.).

Da bi se stvorila takva pasmina svinja, Pfeiffer je prema navodima upravitelja imanja Karla Svobode kupio deset krmača lasaste mangulice i križao ih s nerastima berkšir pasmine. Od 1870. godine svakih 10 godina uvezio je po 10 mladih nerasta pasmine poland kine, od kojih se najbolji nerast koristio za oplodnju sa samo 10 odabranih krmača. Od proizvedenog potomstva, sva ženska grla izlučena su iz rasploda, dok je 10 najboljih muških grla ostavljeno do godine dana i tada je odabran najbolji nerast koji je upotrebljavan za oplodnju najboljih 10 krmača. Od ovih potomaka ostavljeni su nerasti za daljnji rasplod. To se ponavljalo svakih deset godina do 1910. godine kada su uvezena posljednja grla poland kine pasmine. Za tadašnje uzgojne prilike uzgojena pasmina crne slavonske svinje bila je pasmina s dobrim proizvodnim sposobnostima, što dokazuje priznanje koje je dobila na poljoprivrednoj izložbi 1873. godine u Beču, te visoka prodajna cijena u nekim zemljama Europe. Poslije drugog svjetskog rata Crnoj slavonskoj pasmini pokušali su se popraviti nedostatci (kratak trup, slabo razvijene noge i ulegnuta leđa) križanjem s kornvol pasminom (Uremović, 1995.). U prošlosti je crna slavonska svinja bila najraširenija pasmina na području Slavonije te se uvelike koristila za proizvodnju masti i tradicionalnih mesnih proizvoda. Uvozom bijelih mesnatih pasmina svinja od 1950. populacija crnih slavonskih svinja se značajno smanjuje i do sredine 1990-tih postaje ugrožen i sam opstanak pasmine (Uremović, 1995.). Primjerice, efektivna veličina populacije 1996. godine bila je manja od 20 životinja (Uremović i sur., 2000.). Iste godine Republika Hrvatska potpisuje Konvenciju o bioraznolikosti (eng. Biodiversity Treaty; CBD, 1992) te je izrađen "Pregled stanja

biološke i krajobrazneraznolikosti Hrvatske s strategijom i akcijskim planom zaštite" (DUZZP RH, 1999.). Kao rezultat poduzetnih mjera i državne potpore - poticaja uzgajivačima, zaustavljen je pad broja crnih slavonskih svinja, te je iznova aktualiziran ekonomski potencijal pasmine za proizvodnju tradicionalnih mesnih proizvoda (Uremović, 2004.; Karolyi i sur., 2004.; Ekret Kabalin i sur., 2006.; Karolyi i sur., 2007.).



Slika 1. Crna slavonska svinja

(Izvor: <https://www.agroportal.hr/svinjogojstvo/19899>)

Prema morfološkim svojstvima crna slavonska svinja pripada u srednje velike pasmine svinja (60 – 75 cm visina do grebena). Glava je srednje duga, suha s ugnutim profilom, uši su srednje veličine i poluklopave. Vrat je srednje dug, dosta širok i dobre muskulature. Trup je dosta kratak s dubokim i širokim grudnim košem. Sapi su srednje široke i neznatno oborene. Šunke su srednje te obrasle mišićjem. Noge su relativno kratke i tanke. Koža je pepeljaste boje, obrasla crnom srednje dugom i rijetkom ravnom čekinjom. Rilo i papci su crne boje. Krmače imaju najčešće 10, rjeđe 12 crno pigmentiranih sisa. Pasmina je namijenjena ekstenzivnom uzgoju na otvorenim površinama radi čega crna boja predstavlja važnu pasminsku osobinu, tj. zaštitnu funkciju protiv štetnih sunčevih zraka. Ubraja se u prijelazne ili kombinirane pasmine svinja, odnosno svinje za proizvodnju mesa i masti (HPA, 2018.).

2.1.2. Proizvodna svojstva crne slavonske svinje

Crna slavonska svinja poznata je po skromnim proizvodnim svojstvima. Plodnost pasmine je niska. Krmače ove pasmine prase prosječno po leglu 6,3 do 7,4 živorođene prasadi od 0,760 do 1,920 kilograma i 5,7 do 6,6 odbite prasadi po leglu s prosječnom težinom od 8,0 do 12,3 kilograma. Značajna poboljšanja svojstava plodnosti ostvarena su križanjem crne slavonske pasmine s durok pasminom (Uremović i sur., 2003). U intenzivnom tovu postižu dnevni prirast od 500 – 550 g, a za kg prirasta troše 4,5 do 5 kg kukuruza. Na liniji klanja polovice su imale od 32,59% do 42,59% mišićnog tkiva. Kakvoća mesa crne slavonske svinje, procijenjena bojom mesa, pH mesa i sposobnošću vezanja vode je dobra (Uremović, 2004).

Po svojim proizvodnim svojstvima crna slavonska svinja spada u mesno-masni (masno-mesni) tip svinja čije se proizvodne karakteristike očituju umjerenom dužinom tijela, zaobljenim prsima i dobro razvijenim butovima, a omjer prednjeg i stražnjeg dijela tijela iznosi 50% : 50 % (Kralik i sur., 2007.). Na kvalitetu svinjskih polovica i mesa uz genetske čimbenike utjecaj imaju i brojni paragenetski čimbenici, među kojima i završna tjelesna masa svinja u tovu (Senčić, 2008.). U ekstenzivnim uvjetima uzgoja, dnevni prirast od 27 kg do 106 kg iznosio je u prosjeku 478 g uz udio mesa u trupu od 42,95% (Uremović i sur., 2000.). Kod tovljenika slične završne mase, ali hranjenih krmnom smjesom, Senčić i suradnici (2001.) utvrdili su prosječnu mesnatost od 38,50%. U nekoliko ranijih istraživanja još i niža mesnatost je utvrđena u trupova slične mase, a iznosila je 32,59% (Kralik i sur., 1988.).

Osobito svojstvo mesa crne slavonske pasmine svinja u usporedbi s mesom modernih pasmina je visok sadržaj intramuskularne masti. Poznato je da meso svinja crne slavonske pasmine obilježava dobra kvaliteta s visokim sadržajem intermuskularne masti (6-8%), zadovoljavajuća pH vrijednost, dobra sposobnost vezanja vode što ga čini dobrim za tehnološku preradu, posebice za proizvodnju slavonskih šunki i kulena (Senčić i sur. 2010.; Senčić i sur. 2011.).



Slika 2. Prasci crne slavonske svinje

(Izvor: <https://www.cackalo.hr/>)

2.1.3. Tipovi uzgoja svinja na otvorenom

2.1.3.1. Silvo pastoralni tip uzgoja svinja

Navedeni način uzgoja podrazumijeva uzgoj svinja u prirodi, točnije u šumama i pašnjacima. Na ovaj tip uzgoja znatno utječu reljef, klima, tlo i vegetacija okoliša. Osnovu njihove hranidbe čine žir, divlje voće, bukvice, divlji kesten, te gujovice i kukci. Za svinje u tom tipu uzgoja karakteristične su sporije stope rasta, ali izuzetno velika otpornosti. Crna slavonska svinja i turopoljska svinja, kao autohtone pasmine pogodne su za silvo-pastoralni uzgoj. Šumski uzgoj crne slavonske svinje najveći potencijal ostvaruje u hrastovim šumama, no on je moguć i u šumama pitomog kestena ili bukve.

Cilj silvo-pastoralnog načina uzgoja je omogućiti svinjama pašu ili žirovanje koji pašnjak i šuma mogu podnijeti bez degradacije. Prednosti ovakvog načina držanja svinja su: manja financijska ulaganja, ekološka prihvatljivost i uzgoj u skladu s dobrobiti svinja. Kretanjem po šumskim površinama ostvaruje se pozitivan utjecaj na dobrobit i zdravlje svinja i kvalitetu konačnih proizvoda. Nedostaci ovog načina držanja su: mogućnost uništavanja mladih stabala drveća, križanje s divljim pasminama svinja, povećanje brojnosti populacije te konkurencije divljih i domaćih pasmina svinja te mogućnost prijenosa zaraznih bolesti. Silvo-pastoralni način uzgoja svinja široko je rasprostranjen u Španjolskoj gdje je poznat uzgoj Iberijske svinje (Budimir i sur., 2014).

2.1.3.2. Dehesa sustav

Dehesa sustav odnosi se na silvo – pastoralni način uzgoja čiji se razvoj temelji na siromašnim, nepoljoprivrednim površinama s naglaskom na ekstenzivni uzgoj domaćih životinja. U tome uzgoju u većoj mjeri prevladavaju svinje. Ova vrsta uzgoja dolazi od latinske riječi "defesa" koja znači zatvoreno. Do 20. stoljeća taj se pojam odnosio na privatna područja za ispašu bez obzira na tip vegetacije, a od sredine 20. stoljeća taj se termin odnosi na travnjake s raštrkanim drvećem. Uzgoj je zastupljen u jugozapadnom području Španjolske i Portugala, te zauzima prostor od 4 milijuna hektara (Budimir i sur., 2013).

2.1.3.3. Montado sustav

Montado sustav veoma je sličan dehesa sustavu uzgoja. Navedeni sustav uzgoja pretežito ovisi o intenzivnoj proizvodnji žira i uzgoja svinja kojima on predstavlja osnovnu hranu. Hranidba žirom započinje od rujna te traje najmanje dva mjeseca. Po hektaru površine u Montado sustav se može držati dvije svinje, no to ovisi o gustoći drveća po hektaru površine (Budimir i sur., 2014). U Montado sustavu uzgaja se prasad oprašena između travnja i rujna, koja prirast tjelesne mase od najmanje 100kg postiže tijekom sljedeće godine. Za uspješnost razvoja Montado sustava veliku važnost ima mediteranska klima te duga i suha ljeta s temperaturama od 30°C (Mihelčić, 2015).

2.1.4. Načini držanja crne slavonske svinje

Crnu slavonsku pasminu svinja odlikuje otpornost i visoka prilagodljivost na različite uvjete hranidbe, držanja, njege i klime. Upravo zbog toga je ova naša autohtona pasmina dobro rješenje u otvorenom sustavu držanja (Marušić, 2010.). Otvoreni sustav držanja svinja omogućuje svim kategorijama svinja mogućnost slobodnog kretanja (Uremović i Uremović, 1997.). Nužan preduvjet za držanje svinja na otvorenom je posjedovanje dovoljno velikih zemljišnih površina. Na 1ha preporučuje se držati 20-ak krmača (15-20), što ovisi o ukupnoj veličini raspoloživog zemljišta i hranidbi.



Slika 3. Držanje crnih slavonskih svinja na otvorenom

(Izvor: <https://agrobiz.vecernji.hr>)

Na ratarskom zemljištu rotiranje mora biti češće da se tlo ne zagadi mikroorganizmima i parazitima, što je nepovoljno i za životinje i za tlo te da svinje ne unište oranice jer ona služi za naizmjenično držanje svinja i sijanje ratarskih kultura. Pašnjaci za držanje svinja trebaju biti na što ravnijem terenu, gusto zasijani travama zbog erozije tla. Vrlo je važno dobro ih održavati, znači da treba napraviti pregone odvojene električnim pastirima i životinje često premještati. Iskorišteni dio zatim treba urediti (košnja ostataka, drljanje, ravnanje, gnojidba). Paša je vrlo vrijedna krma za rasplodne životinje. Dobra je i kombinacija pašnjaka i dijela oranice zasijanih lucernom, krumpirom, cikorijom pa i povrćem. Teren za držanje svinja na otvorenom mora biti ravan ili vrlo malo nagnut i zaštićen šumom ili grmljem. Tlo treba biti propusno. Sve to ublažiti će opasnost od erozije tla i štititi od udara vjetra.

Oblik površine obično je pravokutan, podijeljen na manje dijelove po skupinama ili u novije vrijeme zrakasto podijeljen na manje dijelove za različite skupine. Na pravokutni oblik terena hrana se donosi u svaki dio, a na zrakasti se doprema za sve skupine s vanjske strane pašnjaka. Skupine se odvajaju električnom ogradom ispod koje se trava tretira herbicidom kako bi se životinje zadržavale dalje od ograde (Pejaković, 2002.). Prema pravilniku o radu UCSS „Fajferica“ (2014.) sve proizvodne površine za uzgoj crne slavonske svinje trebaju imati objekte za različite kategorije svinja.

Krmačarnik predstavlja proizvodnu površinu na kojoj se drže rasplodne krmače (suhe i suprasne) i suprasne nazimice. U sklopu proizvodne površine krmačarnika nalaze se objekti za smještaj krmača, prasilište i pripustilište. Hranidbeni prostor je pod nadstrešnicom, a opremljen je valovima za hranu i vodu. Napajanje se provodi bunarskom vodom iz bunara. Kao posebna cjelina u okviru krmačarnika izdvaja se objekt za prasenje krmača. On se naslanja na ostatak površine krmačarnika, ali je fizički odvojen ogradom. Prasilište se sastoji od objekata s oborima za prasenje, od kojih svaki ima ispust odgovarajuće površine. Svaki obor se sastoji od dijela za prasenje koji je popločen drvenim daskama i koji se nastire steljom, te dijela za kretanje krmače i prasadi (ispust) koji se ne nastire. Krmače s prasadi u oborima prasilišta ostaju 7 tjedana (49-56 dana) nakon čega se provodi odbijanje prasadi od krmače. Prasad se premješta u uzgajalište, a krmače se vraćaju u krmačarnik.

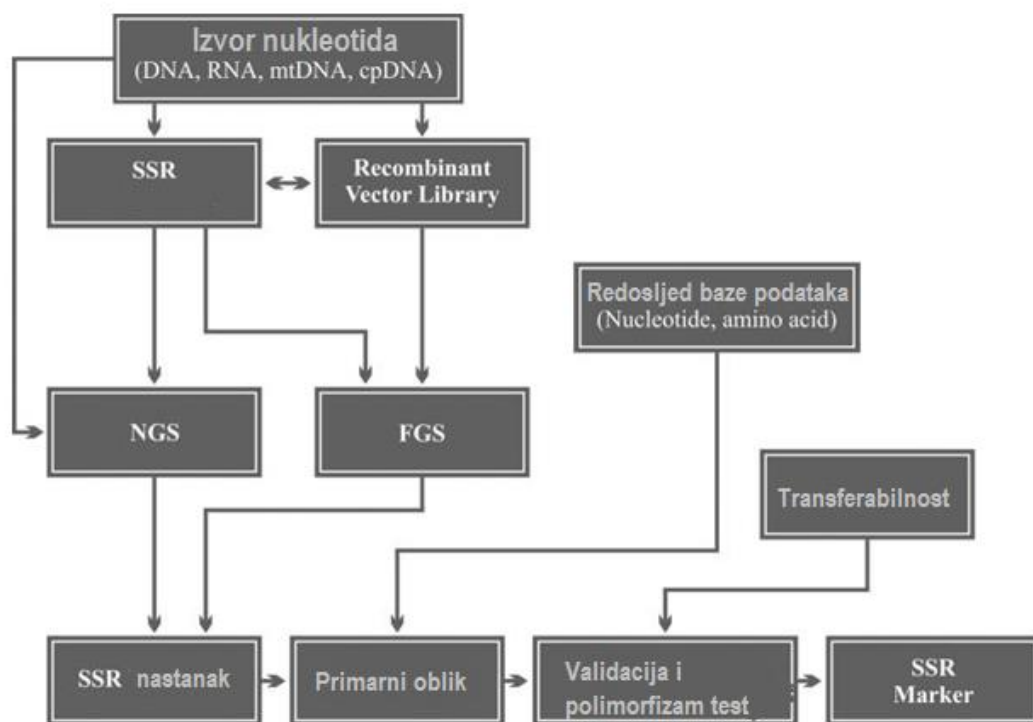
Pripustilište je dio u kojem se vrši pripust ili parenje nerasta i plotkinja (rasplodne krmače i nazimice). Predviđeno je da se pripustilište smjesti u prostoru između krmačarnika i nerastarnika, te da ima ulaze iz obje proizvodne cjeline. Pod nerastarnikom se podrazumijeva proizvodna površina s objektima za uzgoj i držanje nerasta. Nerasti su kategorija muških rasplodnih životinja koji se jedini u cjelokupnom proizvodnom sustavu drže na individualni način, u zasebnim oborima s ispustom. Uzgajalište je dio proizvodnog sustava koji služi za uzgoj prasadi od vremena odbića (49 dana starosti) do težine od 25 (30) kg i približno 100 dana starosti. Prasad se u uzgajalištu drži skupno, slobodnim načinom držanja.

Pod nazimarnikom se podrazumijeva proizvodna cjelina (površine i objekti) na kojoj se provodi uzgoj rasplodnog materijala, tj. ženske i muške nazimadi. Tov svinja predstavlja završnu fazu cjelokupnog ciklusa svinjogojske proizvodnje. Predviđeno je da se tov svinja provodi do završnih tjelesnih težina od 150 do 200 kg, te do starosti tovljenika od 18 - 24 mjeseca.

2.2. Genetska identifikacija autohtonih pasmina svinja

2.2.1. Molekularni markeri- mikrosateliti

Molekularni markeri su podijeljeni u dvije skupine: DNA markeri i izoenzimski markeri. Izoenzimi su različiti molekularni oblici istog enzima koji djeluju na isti supstrat, ali im je električni naboj različit. DNK markeri otkrivaju genetsku varijabilnost izravno na razini DNK. Do sada je poznato više vrsta molekularnih markera, pa su tako jedne od najčešće korištenih jednostavne ponavljajuće sekvence (eng., Simple Sequence Repeats, SSR) ili mikrosateliti. Mikrosateliti su najvažniji markerski sustav u molekularno genetskim istraživanjima, radi čega ih posebno ističemo. Predstavljaju kratke ponavljajuće nukleotidne sekvence (od 2 do 6 nukleotida), ravnomjerno razdijeljene po genomu na više od sto tisuća lokusa (Weber i May, 1989.). Mikrosateliti su većinom visoko polimorfni, što ih čini najinformativnijim genskim markerima (Weber i May, 1989.). Predstavljaju nekodogeni dio DNK, te se često nazivaju “otpadna DNK”. Novija otkrića ukazuju na njihovu važnost pri poravnavanju genske ekspresije (Moxon i Wills, 1999.). Alelne varijante mikrosatelita razlikuju se u broju ponavljanja osnovnog motiva (Wintero i sur., 1992.), što je posljedica mutacija (insercija ili delecija) jednoga ili više osnovnih motiva. Struktura mikrosatelita može biti popunjena (CACACACACACACA), prekinuta (CACACACAggggCACACA) ili sastavljena (CACACACAGTGTGTGTCACA). Stupanj mutacija na nekim mikrosatelitnim lokusima doseže 10^{-3} po generaciji, što je znatno više nego u drugim regijama nukleusnog genoma (Goldstein i sur., 1995.). Stupanj mutacija na mikrosatelitskim lokusima 10 puta je veći nego u mtDNK i 100 do 1000 puta veći nego u DNK introna, zbog čega su idealni markeri za proučavanje genetskih razlika među populacijama (Crawford i Littlejohn, 1998.). Mikrosateliti, radi visokog stupnja polimorfnosti i kodominantnoga načina nasljeđivanja, kao genetski markeri sve se više rabe u selekciji domaćih životinja.



Slika 4. Stupci tijeka rada razvoja SSR markera

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.2.2. Mitohondrijska DNA

Mitohondriji su strukture unutar stanica koje pretvaraju energiju iz hrane u oblik koji stanice mogu koristiti. Dvolančana je uzvojnica koja se sastoji od lakog i teškog lanca. U populacijskoj i evolucijskoj biologiji koristi se kao molekularni marker (Galtier i sur., 2009.). Radi relativno jednostavne organizacije i izolacije, materinskog nasljeđivanja, odsutnosti rekombinacija i usporedivosti homolognih nukleotidnih regija, mtDNK značajan je markerski sustav u populacijskoj i evolucijskoj biologiji (Harrison, 1989.). Jedina nekodogena regija unutar mtDNA je regulatorna regija, koja se radi posebne strukture imenuje kao D-loop (engl. displacement loop). D-loop regija mtDNK predstavlja najvarijabilniji dio mtDNK, s 2,8 do 5,0 puta većom učestalošću supstitucije nukleotida nego u preostalim regijama mtDNK (Aquadro i Greenberg, 1982.; Cann i sur., 1984.), zbog čega je često rabljena u filogenetskim studijama. Prednosti analize mtDNK je njezina zastupljenost u velikom broju kopija te je stoga njezina detekcija lakša, a osim toga mtDNK

nije podložna degradaciji tijekom samog procesa izolacije što olakšava izolaciju te smanjuje mogućnost degradacije (Murugaiah et al., 2015.).



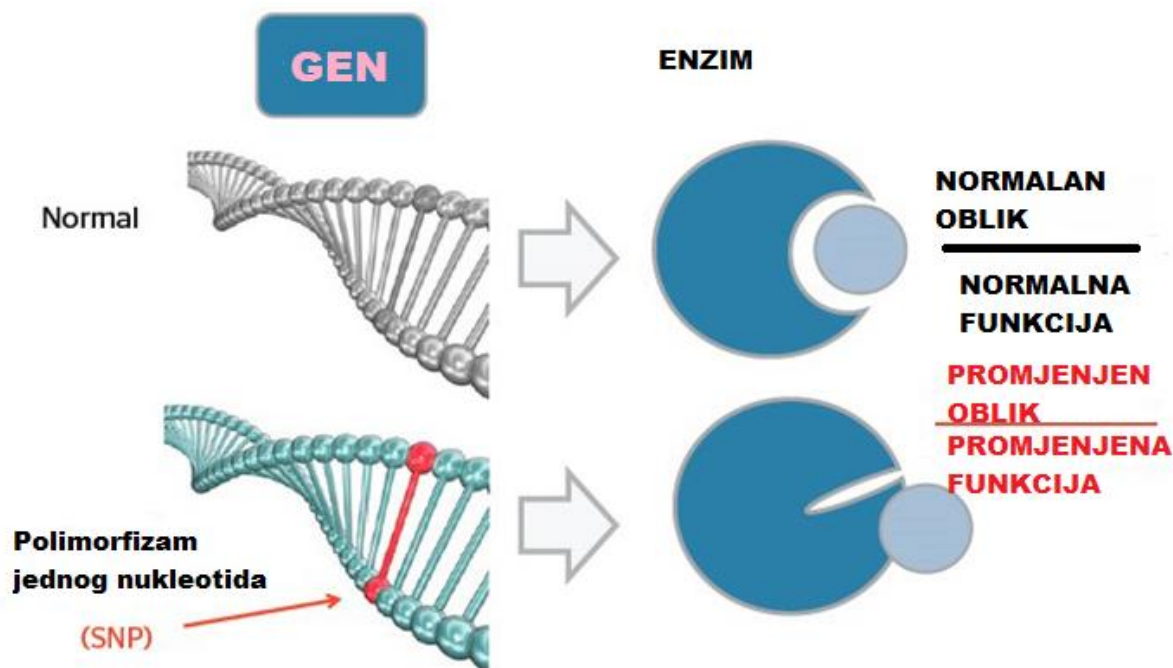
Slika 5. mtDNK svinja

(Izvor: <http://humupd.oxfordjournals.org>)

2.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida

Polimorfizmi jednog nukleotida (eng. Single-nucleotide polymorphism, SNP), koji pripadaju molekulskim markerima posljednje generacije, javljaju se na visokim frekvencijama u životinjskim i biljnim genomima. Razvoj SNP markera omogućava automatizaciju i poboljšanje deseterostrukih djelotvornosti genotipne analize. Postoji nekoliko vrsta SNP-ova. Ovisno o položaju SNP-a u genu, SNP su klasificirani u egzonima (sinonim i ne-sinonim), intronima i promotoru. Svaki SNP predstavlja razliku u jednom građevnom bloku DNA, nazvanoj nukleotid. Na primjer, SNP može zamijeniti nukleotidni citozin (C) s nukleotidnim timinom (T) u određenom djelu DNA. Jedan SNP se nalazi u svakih 300 nukleotida u prosjeku, što znači da u ljudskom genomu ima oko 10 milijuna SNP-ova. Najčešće se ove varijacije nalaze u DNK između gena. Oni mogu djelovati kao biološki markeri (GHR, 2011.). U genetskim istraživanjima SNP-ovi se primjenjuju u utvrđivanju

bioraznolikosti vrsta, određivanju individualne sljedivosti te određivanju roditeljskih jedinki (Farrag i sur., 2010.). Genski markeri koji se mogu koristiti za otkrivanje funkcionalnih SNPova. SNP-ovi postoje u cijelom genomu. Različiti tipovi SNP-ova mogu promijeniti regulaciju i ekspresiju proteina. Neki SNP-ovi su polimorfizmi na mjestima za izrezivanje i rezultiraju različitim proteinima, a razlikuju se u egzonima koje sadrže (Krawczak i sur., 1992.). Neki SNP-ovi nalaze se u promotorskoj regiji te je dokazano kako utječu na regulaciju i ekspresiju proteina (Ligers i sur., 2001.). DNA markeri mogu se razvrstati prema cilju njihove upotrebe: za označavanje pojedinačnog lokusa (RFLP, CAPS, SCAR, STS, SSR, SNP) ili genomski otisak prsta (RAPD, AFLP, SSAP, ISSR, multilokus markeri) koja se temelji na Southern hibridizaciji. Ova klasifikacija dodjeljuje oznake monolokusu (u pravilu, jedan lokus po diploidnom genomu je prisutan) i multilokus (koji pojačavaju brojne fragmente genomske DNA). Prema trećoj klasifikaciji (prema vrsti detektirani polimorfizam), markeri su grupirani u one koji otkrivaju polimorfizam u broju tandem ponavljanja mini- i mikrosatelitskih lokusa i onih u otkrivanju polimorfizma među sljedovima DNK, uključujući supstitucije nukleotida (Khlestkina i sur., 2005.).



Slika 6. SNP često mijenja oblik i / ili smanjuju funkciju enzima. Rijetko, SNP-ovi mogu poboljšati funkciju enzima (nije prikazano)

(Izvor: <https://www.puregenomics.com>)

Tijekom 1980. te dolazi do prvog pojavljivanja mikročipova, a do danas su postali alat za provođenje analiza u području sigurnosti hrane i autentifikacije. Primjena mikročipova temelji se na spajanju različitih proba s različitim pozicijama na čipu što omogućava istovremeno praćenje velikog broja umnoženih fragmenata, a samim time i detekciju većeg broja različitih životinjskih vrsta u uzorku koji se analizira (Teletchea i sur., 2008.). Metoda qPCR i mikročipova, dvije su metode analize koje se često uspoređuju. Metode primjene čipova znatno su brže i preciznije u odnosu na PCR metodu. U odnosu na qPCR, mikročipovi imaju znatno nižu razinu detekcije te stoga nije moguće dobiti kvantitativne informacije kojima bi se točno mogao utvrditi odnos slučajnog i namjernog dodavanja stranih supstanci u mesne prerađevine (Iwobi i sur., 2011.).



Slika 7. CarnoCheck sustav detekcije može identificirati 8 različitih vrsta životinja

(Izvor:<https://www.gbo.com/>)

CHIPRON LCD kit i CarnoCheck sustav detekcije dva su tipa DNK mikročipa specifična za vrste. CHIPRON LCD kit odnosi se na 16S rRNK gen, a CarnoCheck sustav detekcije temelji se na genu za mitohondrijski citokrom b. CHIPRON LCD omogućuje identificiranje 14 različitih vrsta životinja, dok CarnoCheck sustav detekcije može identificirati 8 različitih vrsta životinja (Ali i sur., 2012.). Kao brza metoda, primjena DNK čipova služi za provjeru proizvoda od mesa. Postoji niz istraživanja koja su provedena i kojima su se mikročipovi

primjenjivali za identifikaciju različitih vrsta. Teletcha i sur. (2008.) razvili su metodu temeljenu na mikročipovima kojom su analizirali veliki broj životinjskih vrsta u uzorcima. Istraživanjem je identificirano 40 vrsta sisavaca, 28 vrsta riba, 9 vrsta ptica i 2 vrste morskih pasa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno na 50 svinja crne slavonske pasmine (CS). Uzorci krvi su prikupljeni s prostorni udaljenih područja kako bi se smanjila mogućnost pojave srodstva između životinja. Uzorci krvi uzeti su ubodom igle u vratnu venu te pohranjeni u vakutajnere koji su sadržavali antikoagulans K3.

3.2. Analiza DNK

Genomska DNK izolirana je iz krvi korištenjem ThermoScientific Gene Jet Genomic DNA Purification Kita prema protokolu proizvođača. Uspješnost izolacije provjerena je elektroforezom na 1,0% agaroznom gelu. Nakon postupka izolacije, DNK je pohranjena na -20°C do daljnje obrade.

3.3. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa

Prema ISAG-FAO preporuci za genescan analizu korišten je set sljedećih mikrosatelitnih lokusa: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw9366, S0218, S0228, Sw240, Sw2406, Sw122, Sw857, 0097, Sw72, S0226, Sw911, S0002, Sw1067 i S0101. Mikrosateliti su bili grupirani u tri združene reakcije (Tablica 1) s obzirom na duljinu fragmenata i temperaturu taljenja. Za označavanje uzvodnih početnica korištena je jedna od tri fluorescentne boje (F- 6-FAM – plava, ATTO550- žuta, H- HEX zelena). Uzvodne početnice sintetizirali su Metabion International, Planegg, Njemačka, dok su neoznačene, nizvodne početnice sintetizirane u Macrogenu. Združene PCR reakcije su provedene pomoću 2x Type-itMicrosatellite PCR Kit (QiagenGmbH, Germany) prema protokolu proizvođača. PCR protokol je započeo s početnom aktivacijom u trajanju od 6 minuta na 95 °C, zatim 35 ciklusa denaturacije (30 s pri temperaturi 95 °C), anilingom (90 s pri temperaturi od 58, 59 i 59,5 °C) te ekstenzijom (60 s pri temperaturi 72 °C). Završna ekstenzija je trajala 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. Produkti PCR reakcije su analizirani uz GeneScan350 ROX internal standard na ABI3730XL kapilarnoj elektroforezi (Macrogen Inc., Netherlands). Rezultati analize .fsa dokumenti (elektroferogrami) su otvarani pomoću Peak Scanner (*AppliedBiosystems*) softvera.

Tablica 1. Mikrosateliti grupirani u tri združene reakcije

Združeni PCR	Marker	Kromosom	Sekvenca početnice (5' -> 3')	Temperatura	Veličina fragmenta
1	S0026	16	F-AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	55°C	87 - 105
	S0155	1	F-TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG AAAGTGGAAGAGTCAATGGCTAT	55°C	142 - 162
	S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
	Sw2410	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
	Sw830	10	A-AAGTACCATTGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAGACCTGTG	50°C	168 - 203
	S0355	15	A-TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	50°C	244 - 271
	Sw24	17	H-CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	55°C	95 - 124
	Sw632	7	H-TGGGTTGAAAGATTTCCCAA GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	55°C	148 - 178
	Sw1941	13	H-AGAAAGCAATTTGATTTGCATAATC ACAAGGACCTACTGTATAGCACAGG	55°C	202 - 224
2	Sw936	15	F-TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	55°C	90 - 116
	S0218	X	F-GTGTAGGCTGGCGGTTGT CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	55°C	158 - 205
	S0228	6	F-GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCACCTCATCTTATCTACACT	55°C	220 - 246
	Sw122	6	A-CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA TTGTCTTTTATTTTGCTTTTGG	55°C	106 - 128
	Sw857	14	A-TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	55°C	141 - 159
	S0097	4	A-GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAACTT	55°C	209 - 250
	sw240	2	H-AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAAGTCCCTAGCAAA	55°C	92 - 124
	Sw2406	6	H-AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	55°C	222 - 262
3	Sw72	3	F-ATCAGAACAGTGCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTTC	55°C	97 - 114
	S0226	2	F-GCACTTTTAACTTTTCATGATACTCC GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA	55°C	180 - 210
	Sw1067	6	A-TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAAACAAAAAG	55°C	136 - 176
	S0101	7	A-GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	58°C	197 - 221
	Sw911	9	H-CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAGCC	60°C	149 - 173
	S0002	3	H-GAAGCCAAAGAGACAATGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA	60°C	186 - 216

F- 6-FAM; A- ATTO550; H- HEX

3.4. Statistička obrada podataka

Frekvencija alela, broj alela, promatrana i očekivana heterozigotnost te Wrightova Fis statistika prema Weiru i Cockerhamu izračunate su pomoću GENETIX 4.05.2 software paketa te programskog paketa GenAlEx (Belkhir i sur., 2004.; Peakall i Smouse, 2012.). Informacijski sadržaj polimorfizma (eng. Polymorphism information content, PIC) izračunat je programom Cervus 3.0.7. (Marshall i sur., 1998.; Kalinowski i sur., 2007.). Klaster analiza je odrađena pomoću STRUCTURE 2.1. programa (Pritchard i sur., 2000). Program je pokrenuti 10 puta za K vrijednosti od 2 do 5. Broj genetskih klastera K određen je metodom po Evannu i sur. (2005.) koja se temelji na pronalaženju prekida logaritamske distribucije $\ln P(D)$ za različite vrijednosti K. Rezultati analize dobiveni STRUCTURE programom vizualizirani su pomoću Clumpak software paketa (Kopelman i sur., 2015.).

4. REZULTATI

4.1. Genetska varijabilnost unutar populacije

Tablica 2. Broj alela (N), očekivana heterozigotnost (H_{exp}), uočena heterozigotnost (H_{obs}), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) te Wrightova F statistika za crnu slavonsku pasminu uz set od 23 mikrosatelitska markera

MS	N	H_{exp}	H_{obs}	F_{is}	PIC
S0026	4	0,6819	0,6143	0,106	0,634
S0155	7	0,7730	0,7143	0,083	0,737
S0005	19	0,8927	0,8714	0,031	0,884
Sw24	6	0,4509	0,4286	0,057	0,421
Sw632	6	0,5016	0,4429	0,124	0,451
Swr1941	8	0,6337	0,3000	0,532	0,582
Sw2410	8	0,7508	0,7143	0,056	0,716
Sw830	8	0,7615	0,6857	0,107	0,732
S0355	8	0,7901	0,7000	0,121	0,759
Sw9366	7	0,6696	0,6857	-0,017	0,632
S0218	2	0,4739	0,2857	0,403	0,362
S0228	7	0,2251	0,2429	-0,072	0,220
sw240	9	0,7942	0,7429	0,072	0,767
Sw2406	10	0,7544	0,5429	0,287	0,719
Sw122	9	0,8394	0,8286	0,020	0,819
Sw857	6	0,7100	0,6429	0,102	0,664
S0097	7	0,7980	0,8429	-0,049	0,769
Sw72	5	0,6828	0,6286	0,087	0,618
S0226	8	0,8249	0,8571	-0,032	0,802
Sw911	8	0,7567	0,8000	-0,050	0,718
S0002	10	0,7770	0,7000	0,106	0,753
Sw1067	9	0,5905	0,5429	0,088	0,554
S0101	9	0,6213	0,5571	0,110	0,568
Prosječno	7,826	0,685	0,625	0,098	0,647

*Broj alela=N, očekivana heterozigotnost= H_{exp} , uočena heterozigotnost= H_{obs} , koeficijent inbridinga= F_{is} , informacijski sadržaj polimorfizma=PIC

U tablici 2. su prikazane vrijednosti broj alela (N), uočene i očekivane heterozigotnosti (H_{obs} , H_{exp}), koeficijenta inbridinga (F_{is}) te informacijskog sadržaja polimorfizma (PIC). Prosječan broj alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje iznosio je 7,826. Najveći broj alela, njih 19, zabilježen je na markeru SO005, dok je najmanje alela tek 2, zabilježeno na markeru SO218. Vrijednost očekivane heterozigotnosti za analizirane mikrosatelitske markere iznosila je 0,685, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,625.

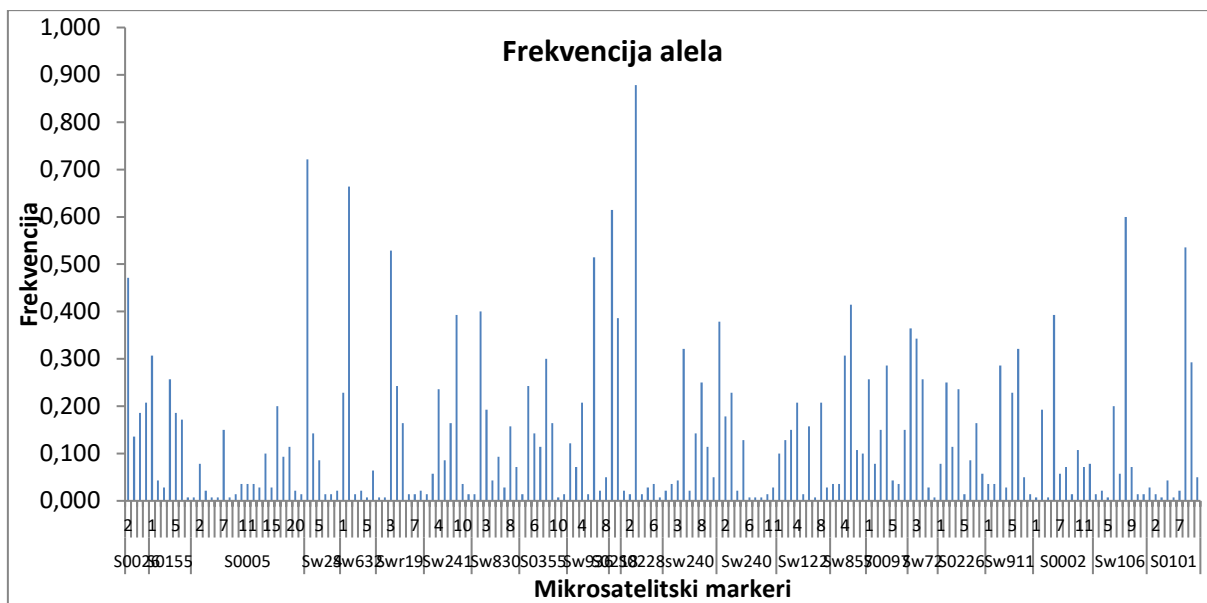
Srednja PIC vrijednost iznosila je 0,647 što označava visoko informativne markere. Najniža vrijednost je zabilježena na markeru S0228 (0,220) a najviša je iznosila 0,884 te je uočena na S0005 markeru. Koeficijent inbridinga, F_{is} , označava stupanj križanja u bliskom srodstvu mjereći gubitak heterozigotnosti unutar populacije. Srednja vrijednost koeficijenta inbridinga iznosila je 0,098.

Tablica 3. Frekvencije alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera

Marker	Alel	Frekvencija alela	Prosječna frekvencija	Marker	Alel	Frekvencija alela	Prosječna frekvencija		
S0026	2	0,471	0,250	Sw122	1	0,100	0,111		
	3	0,136			2	0,129			
	4	0,186			3	0,150			
	5	0,207			4	0,207			
S0155	1	0,307	0,143		5	0,014		0,167	
	2	0,043			6	0,157			
	3	0,029			7	0,007			
	4	0,257			8	0,207			
	5	0,186			9	0,029			
	6	0,171		1	0,036	0,143			
	7	0,007		2	0,036				
S0005	1	0,007	0,053	Sw857	4		0,307	0,200	
	2	0,079			5		0,414		
	3	0,021			6		0,107		
	4	0,007			7		0,100		
	5	0,007			1		0,257		0,125
	7	0,150		2	0,079				
	8	0,007		3	0,150				
	9	0,014		4	0,286				
	10	0,036		5	0,043				
	11	0,036		6	0,036				
	12	0,036		7	0,150				
	13	0,029		S0097	1	0,364	0,125		
	14	0,100			3	0,343			
	15	0,029			4	0,257			
	16	0,200			5	0,029			
	18	0,093			6	0,007			
	19	0,114		Sw72	1	0,079	0,125		
	20	0,021			2	0,250			
	23	0,014			3	0,114			
Sw24	2	0,721	0,167		S0226	4		0,236	0,125
	3	0,143		5		0,014			
	5	0,086		7		0,086			
	6	0,014		8		0,164			
	7	0,014		9		0,057			
	8	0,021		Sw911		1	0,036	0,125	
	Sw632	1				0,229	2		
2		0,664	3		0,286				
3		0,014	4		0,029				
4		0,021	5		0,229				
5		0,007	6		0,321				
6		0,064	7		0,050				
Swr19	1	0,007	0,125	S0002	8	0,014	0,100		
	2	0,007			1	0,007			
	3	0,529			4	0,193			
	4	0,243			5	0,007			
	5	0,164			6	0,393			
	6	0,014			7	0,057			
	7	0,014			8	0,071			
Sw241	8	0,021	0,125		9	0,014		0,111	
	2	0,014			10	0,107			
	3	0,057			11	0,071			
	4	0,236			12	0,079			
	5	0,086			Sw106	3			0,014
	6	0,164		4		0,021			
	8	0,393		5		0,007			
10	0,036	6	0,200						
11	0,014	7	0,057						
Sw830	1	0,014	0,125	8	0,600	0,111			
	2	0,400		9	0,071				

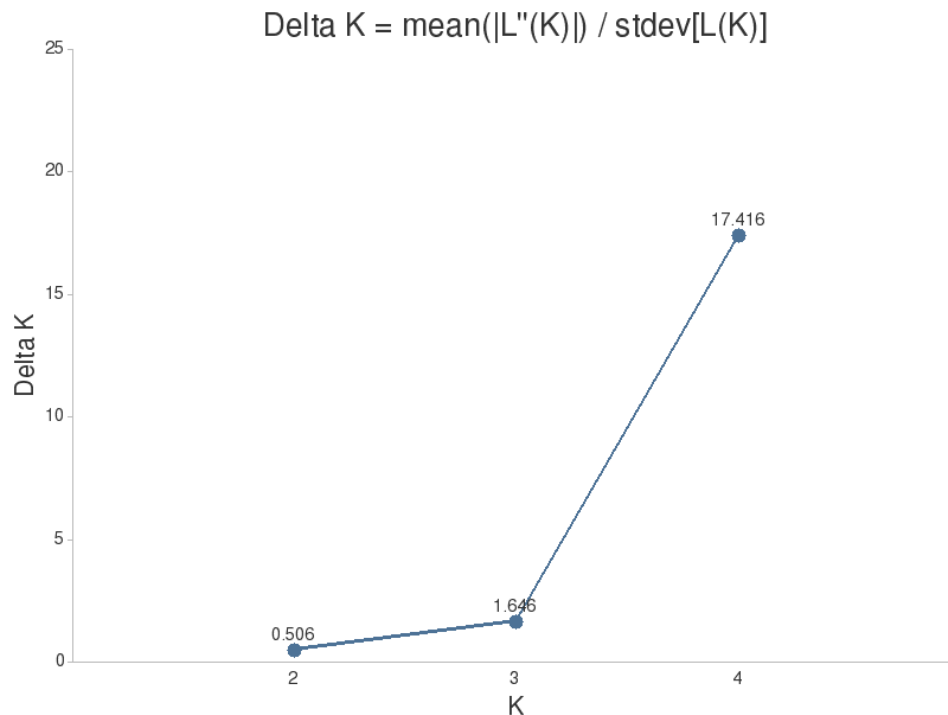
	3	0,193			10	0,014	
	4	0,043			12	0,014	
	5	0,093			1	0,029	
	6	0,029			2	0,014	
	8	0,157			4	0,007	
	9	0,071			5	0,043	
S0355	1	0,014	0,125	S0101	6	0,007	0,111
	4	0,243			7	0,021	
	6	0,143			8	0,536	
	7	0,114			9	0,293	
	8	0,300			10	0,050	
	9	0,164			1	0,021	
	10	0,007			2	0,036	
Sw936	11	0,014	0,143	sw240	3	0,043	0,111
	1	0,121			4	0,321	
	2	0,071			6	0,021	
	4	0,207			7	0,143	
	5	0,014			8	0,250	
	6	0,514			9	0,114	
	7	0,021			11	0,050	
S0218	8	0,050	0,500		1	0,379	
	3	0,614			2	0,179	
S0228	4	0,386	0,143	Sw2406	3	0,229	0,100
	1	0,021			4	0,021	
	2	0,014			5	0,129	
	3	0,879			6	0,007	
	4	0,014			7	0,007	
	5	0,029			8	0,007	
	6	0,036			9	0,014	
	7	0,007		11	0,029		

Tablicom 3. su prikazane frekvencije alela za analizirane mikrosatelitske markere. Prosječne vrijednosti frekvencija su se kretale u rasponu od 0,053 koja je zabilježena na markeru S0005 do 0,500 što je zabilježeno na markeru SO218. S obzirom na to da je najniža vrijednost zabilježena na markeru s najvećim brojem alela (19) ovaj marker se ne promatra kao marker s manjom informativnosti. Grafički prikaz frekvencija alela za analizirane mikrosatelitske markere unutar populacije crne slavonske svinje prikazan je Grafom 1.



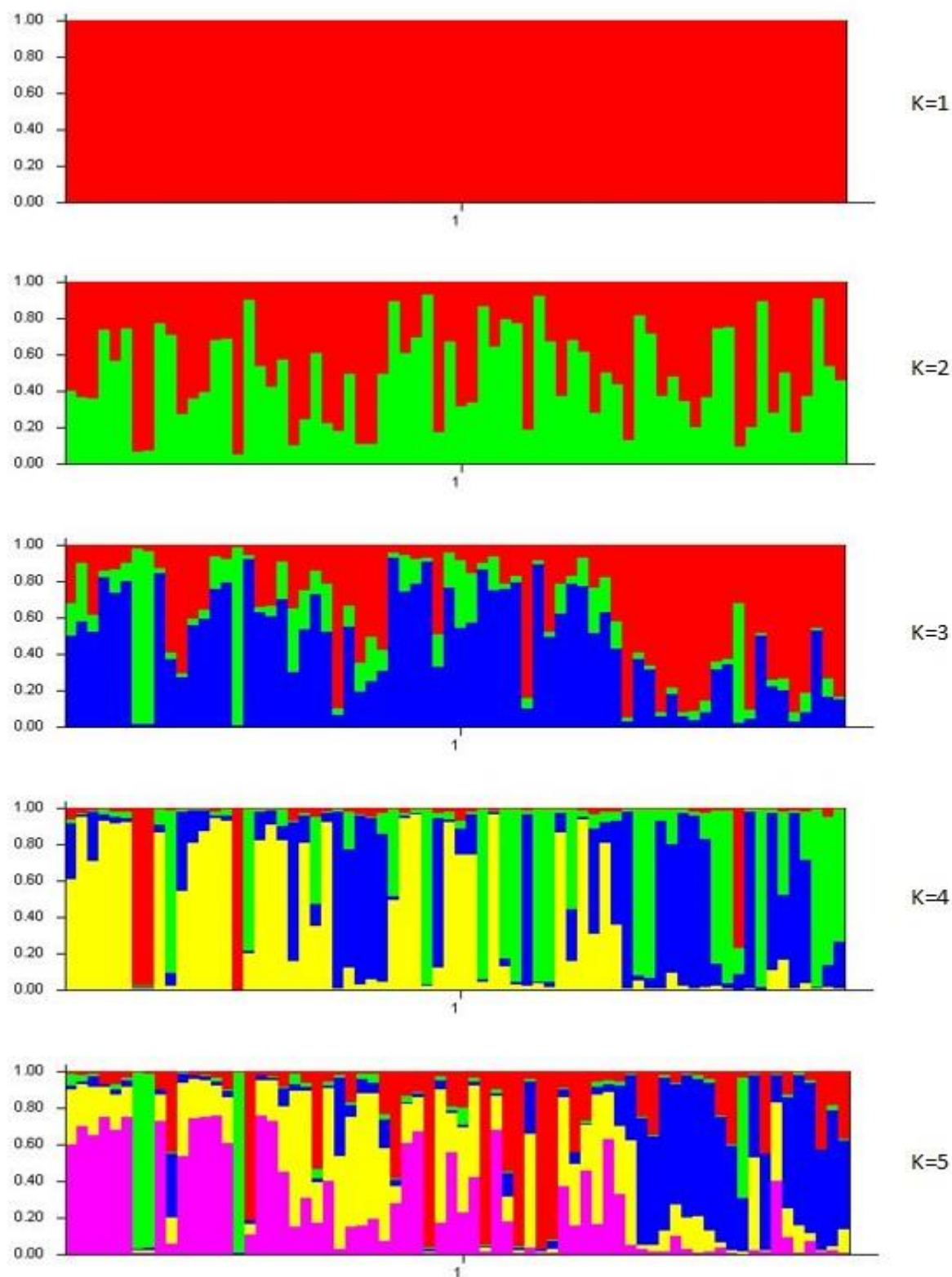
Graf 1. Frekvencija alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje

4.2. Genetska struktura populacije



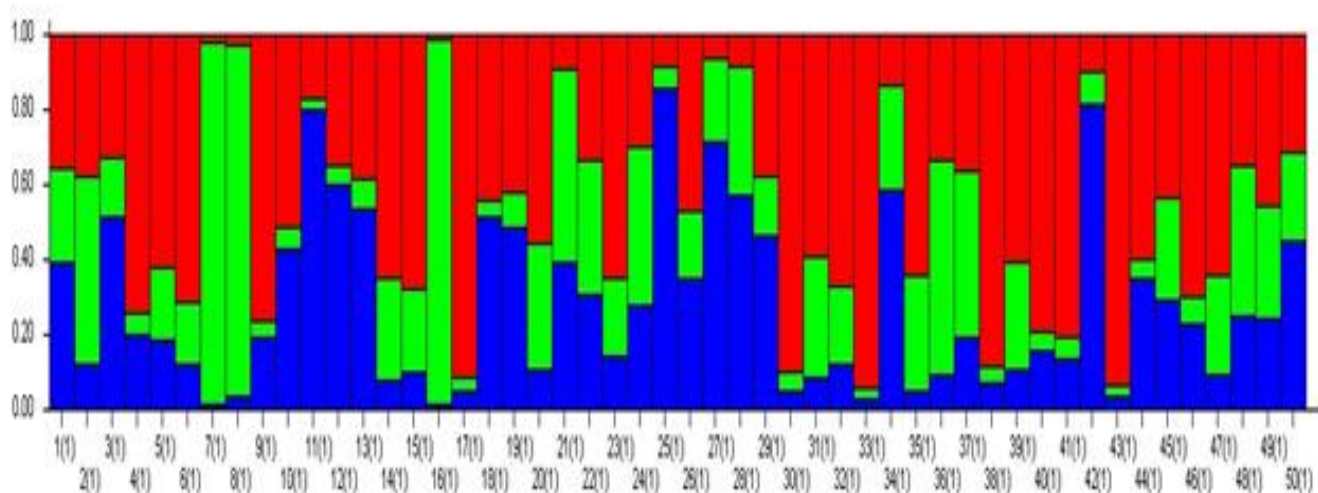
Graf 2. Broj genetskih klastera K određen metodom prema Evannu i sur. (2005.)

Broj genetskih klastera, K, određen je metodom prema Evannu i sur. (2005.) te prikazan Grafom 2. K označava broj genetskih klastera, dok je $\ln P(D)$ procjena *a posterior* vjerojatnosti za predloženi K. Iz grafa je uočljivo pretpostavljanje tri populacije crne slavonske svinje.



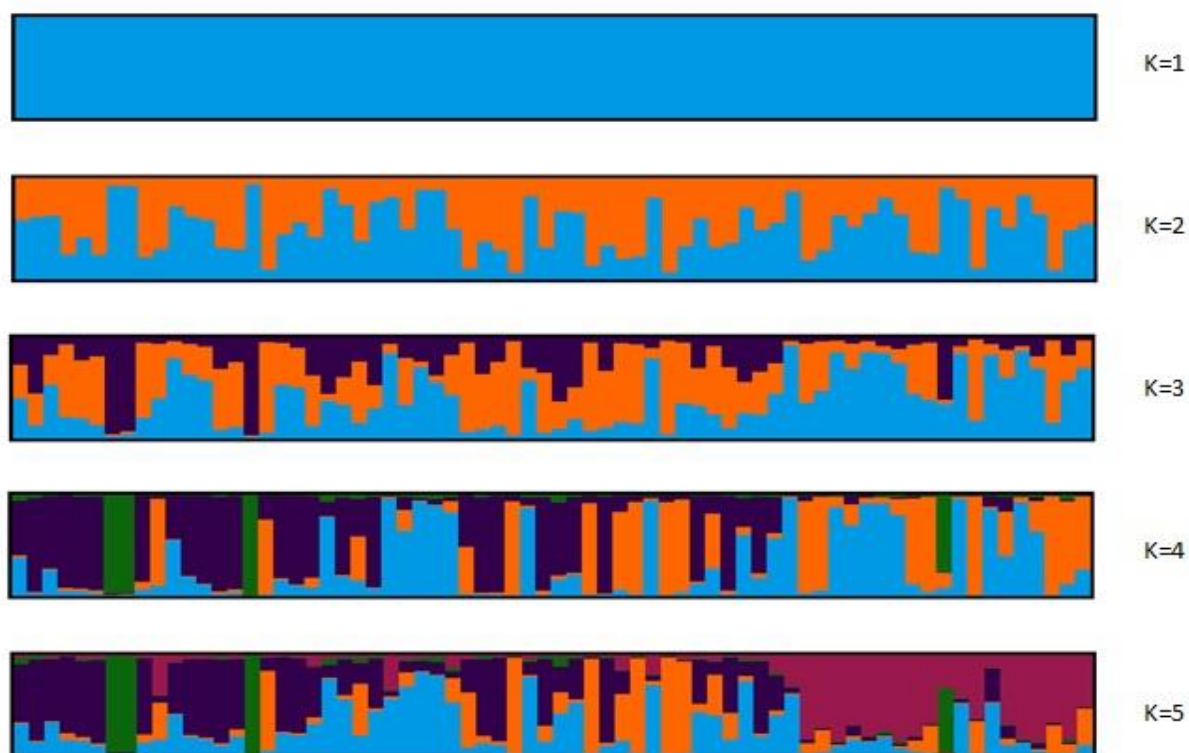
Slika 8. Rezultati STRUCTURE analize uz K=1 do K=5

Slikom 8. su prikazani rezultati analize provedeni uz K=1 do K=5. Uz K=2 jasno se vidi odvajanje populacije na dva genetska klastera, jednako kao i pri pretpostavljanju tri populacije, K=3. Uz pretpostavljanje tri populacije svinja, jasno se vidi odvajanje i grupiranje životinja u posebne genetske klaster. Pri većim K vrijednostima (K=4, K=5) dolazi do rasipanja rezultata što ih čini nepouzdanima za daljnju obradu.



Slika 9. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 23 mikrosatelitska markera

Iz rezultata analize prikazanih slikom 9. jasno je uočljivo postojanje pretpostavljena tri genetska klastera. Svaka linija prikazuje pojedinu životinju unutar analizirane pasmine. Rezultati obrade podataka Clumpak programom potvrđuju rezultate genetske analize u STRUCTURE programu. Pri K=3 jasno se vidi postojanje tri genetska klastera dok je pri K=4 te K=5 došlo do rasipanja rezultata.



Slika 10. Vizualizacija rezultata STRUCTURE analize pomoću Clumpak softvera

5. RASPRAVA

Provedena su brojna istraživanja koja su uključivala mikrosatelite kao markere kojima se ispitala genetska struktura autohtonih pasmina svinja. Michailidou i sur. (2014.) su koristili set od 11 mikrosatelitskih markera kojima su istražili genetsku strukturu grčkih pasmina svinja. Rezultati istraživanja su ukazali na visok stupanj polimorfizma unutar i između populacija temeljem broja alela po lokusu i njihove genetske heterozigotnosti što upućuje na visok stupanj varijabilnosti unutar pasmine što potvrđuje mikrosatelitske markere kao dobar sustav za identifikaciju pasmine.

Orru i sur. (2006.) proveli su istraživanje u kojem su koristili set od 13 mikrosatelitskih markera kako bi identificirali 4 pasmine goveda. Autori su predložili metodu koja se temelji na procjeni broja alela fiksiranih na određenim lokusima koji su karakteristični za pasminu te na temelju razlika u frekvenciji alela. Distribucija alela koja je nejednaka između pasmina rezultira razlikama u frekvenciji istog lokusa između pasmina. Rezultat primjene predložene metode određivanje je mikrosatelita koji se mogu kombinirati u združenim PCR reakcijama te na taj način omogućiti provođenje identifikacije pasmine i autentifikacije proizvoda. Li i sur. (2004.) istražili su genetsku varijabilnost europskih i kineskih pasmina svinja pomoću seta od 19 mikrosatelita. Rezultati su ukazali na manju pasminsku i međupasminsku varijabilnost europskih pasmina nego što je to kod kineskih pasmina.

Prema Barkeru (1994.) broj alela po lokusu ne bi trebao biti manji od 4, a prosječna vrijednost heterozigotnosti u populaciji mora biti u granicama od 0,3 i 0,8. U našem istraživanju broj alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje iznosio je 7,826. Najveći broj alela, njih 19, zabilježen je na markeru SO005, dok je najmanje alela tek 2, zabilježeno na markeru SO218.

Vrijednost očekivane heterozigotnosti za analizirane mikrosatelitske markere iznosila je 0,685, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,625. Rezultati naših istraživanja ukazali su na visoku razinu genetske raznolikosti. Botsteinetal (1980.) navodi da su vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti važni parametri koji ukazuju na odabir markera pomoću kojih identificiramo određenu pasminu. Za uspješnu identifikaciju pasmine, vrijednosti očekivane heterozigotnosti trebaju biti više od 0,5 - 0,6. Gama i sur. (2013.) su istražili genetsku strukturu iberijske pasmine svinja i stupanj križanja s divljim

pasminama svinja. U istraživanju je korišteno 3 portugalske autohtone pasmine (altežano, bisaro i malhado) te 12 španjolskih autohtonih pasmina svinja. Za istraživanje je korišten set od 24 mikrosatelitska markera. Rezultati istraživanja su ukazali na prosječnu vrijednost očekivane heterozigotnosti 0,800 te uočene heterozigotnosti 0,718. Revidatti i sur. (2014.) istražili su genetski status kriolo pasmine uz set od 24 mikrosatelitska markera. Rezultati istraživanja ukazali su na vrijednosti očekivane i uočene heterozigotnosti od 0,62 i 0,57. Pardo i sur. (2014.) su istražili genetsku strukturu, tierralta, južnoameričke autohtone pasmine svinja. Istraživanje je provedeno uz set od 20 mikrosatelitska markera. Prosječna vrijednost očekivane heterozigotnosti iznosila je 0,525 dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,510.

Istraživanja genetske strukture populacije crne slavonske svinje pomoću mikrosatelita kao molekularnih markera proveli su Druml i sur. (2012.), Bradić i sur. (2007.) i Margeta (2012.), Gvozdanić i sur. (2018.). Druml i sur. (2012.) su uz set od 19 mikrosatelitskih markera proveli istraživanje na 40 životinja crne slavonske pasmine. Očekivana heterozigotnost prema Druml i sur. (2012.) iznosila je 0,64 dok je vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,59. U ovom radu vidljive su veće vrijednosti očekivane heterozigotnosti koja iznosi 0,68 i prosječne vrijednosti uočene heterozigotnosti koja iznosi 0,62. Prosječan broj alela u našem istraživanju bio je 7,826 što nam pokazuje veću vrijednost nego u istraživanju koje su proveli Druml i sur. (2012.). Srednja vrijednost koeficijenta inbridinga iznosila je 0,098 te nije uočena statistička značajnost F_{is} vrijednosti. Bradić i sur. (2007.) uz set od 8 mikrosatelitskih markera proveli su istraživanje na 42 životinje sa 6 različitih lokacija. Autori navode da je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,357 što je niže od vrijednosti uočene heterozigotnosti dobivene našim istraživanjem.

Prema Bradić i sur. (2007.) broj alela iznosi $2,50 \pm 0,76$ što je znatno manje nego vrijednost dobivena našim istraživanjem. Margeta (2012.) je uz set od 18 mikrosatelitskih markera proveo istraživanje genetske strukture crne slavonske pasmine. Rezultati očekivane heterozigotnosti iznosila je 0,62 dok je zabilježena vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,57 što su niže vrijednosti nego u ovom istraživanju. Prema Margeti (2012.) prosječan broj alela po lokusu iznosi je 5,61 što pokazuje nižu vrijednost od vrijednosti koje su dobivene u ovom radu.

Informacijski sadržaj polimorfizma određuje informativnost određenog markera. Bolstein i sur. (1980.) navode da su markeri sa $PIC > 0,5$ visoko informativni, srednji stupanj

informativnosti imaju markeri kod kojih je zabilježena $PIC > 0,25$ dok niski stupanj informativnosti imaju markeri sa PIC vrijednostima $< 0,25$. U našem istraživanju srednja PIC vrijednost iznosi 0,65 što ga čini dobrim markerom kojim se može provesti autentifikacija proizvoda. Saho i sur. (2016.) temeljem mikrosatelitske analize indijskih autohtonih pasmina utvrdili PIC vrijednosti od 0,41 do 0,81 što je više nego u našem istraživanju.

6. ZAKLJUČAK

Korištenje mikrosatelita te rezultati statističke odbrade podataka identificirali su životinje crne slavonske pasmine svinja. Nadalje, korišteni set mikrosatelita bio je dovoljno informativan za razvrstavanje svinja u tri odvojena genetska razreda iz čega se može zaključiti da unutar pasmine crne slavonske svinje dolazi do raslojavanja pasmine. Postojanje tri genetska klastera ukazuje na križanje svinja s pripadnicima drugih pasmina svinja no da bi se utvrdilo koje su pasmine prisutne potrebno je provesti opsežnije istraživanje. Temeljem provedenog istraživanja proizlazi zaključak da su mikrosateliti kao molekularni markeri dobar markerski sustav za identifikaciju pasmine. Predlažu se daljnja istraživanja kojima bi se moglo utvrditi podrijetlo proizvoda dobivenih od svinja crne slavonske pasmine.

7. POPIS LITERATURE

1. Ali, M.E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y.B.C. (2012.): Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products. *Food Analytical Methods*, 5(3): 613-623.
2. Aquadro, C.F., Greenberg, B. D. (1982.): Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103: 287-312.
3. Barać, Z., LJ. Bedrica, M. Čačić, M. Dražić, M. Dadić, M. Ernoić, M. Fury, Š. Horvath, A: Ivanković, Z. Janječić, J. Jeremić, N. Kezić, D. Marković, B. Mioč, R. Ozimec, D. Petanjek, F. Poljak, Z. Prpić, M. Sindićić (2011.): Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, Hrvatska poljoprivredna agencija, Republika Hrvatska. Zagreb. 258-263.
4. Barker, J.S.F. (1994): A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. *Proc. 5th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Guelph, Canada 21:501–508.
5. Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, Catch, F. (2004.): "Genetix 4.05. 2." University of Montpellier II, Laboratoire Génome et Populations, Montpellier, France.
6. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980.): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314- 331.
7. Bradić, M., Uremović, M., Uremović, Z., Mioč, B., Konjačić, M., Luković, Z., Safner, T. (2007.): Mikrosatelitna analiza genetske raznolikosti Crne slavonske svinje. *Acta veterinaria*, 57(2-3): 209-215.
8. Brkić, A. ; Menčik, S. ; Bačani, E. ; Kabalin, A. E. (2014.): Polimorfizam PRLR-gena u krmača crne Slavonske pasmine svinja: preliminarni rezultati. *Stočarstvo*. 68: 75-82
9. Crawford, A.M., Dodds, K.G., Ede, A.J., Pierson, C.A., Montgomery, G.W., Garmonsway, H.G., Beattie, A.E., Davies, K., Maddox, J. F., Kappes, S.W., Stone, R.T., Nguyen, T.C., Pentty, J.M., Lord, E.A., Broom, J.E., Buitkamp, J., Schwaiger, W., Epplen, J.T., Matthew, P., Matthews, M.E., Hulme, D.J., Beh, K.J., McGraw,

- R.A., Beattie, C.W. (1995.): An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140: 703-724.
10. Druml, T., Salajpal, K., Dikic, M., Urosevic, M., Grilz-Seger, G., Baumung, R. (2012.): Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programs. *Genetics Selection Evolution*, 44(1): 5.
 11. Ekert Kabalin, A., Balenović, T., Sušić, V., Štoković, I. (2006.): Crna slavonska svinja. IV. Simpozij poljoprivrede, veterinarstva, šumarstva i biotehnologije, Zenica, Bosna i Hercegovina.
 12. „Fajferica“ udruga uzgajivača Crne slavonske svinje Slavonije, Baranje i zapadnog Srijema. Pravilnik o radu UCSS „Fajferica“ (2014.)
 13. Farrag, S.A., Tanatarov, A.B., Sottan, M.E. (2010.): Using of DNA fingerprinting in poultry Research. *International Journal of poultry science*, 9(5): 406-416.
 14. Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. (2009.): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, vol. 18, 4541-4550.
 15. Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W. (1995): An evaluation of genetic Distances for Use With Microsatellite Loci. *Genetics* 139, 463-471.
 16. Gvozdanović K. (2018.): Identifikacija pasmine i autentifikacija proizvoda crne slavonske svinje. Doktorska disertacija.
 17. Ivanković, A. (2005.): Uporaba molekularne genetike u animalnoj proizvodnji, *Stočarstvo* 59, 121-144.
 18. Iwobi, A. N., Huber, I., Hauner, G., Miller, A., Busch, U. (2011.): Biochip technology for the detection of animal species in meat products. *Food Analytical Methods*, 4(3): 389-398.
 19. Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007.): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106.
 20. Karolyi, D., Luković, Z., Salajpal, K., Đikić, M. (2010.): Black Slavonian pig – a breed for extensive husbandry. *Acta agraria kaposvariensis*, 14 (2): 221-227.
 21. Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., Mayrose, I. (2015.): Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5): 1179- 1191.

22. Krawczak, M. Reiss, J., Cooper, D.N. (1992.): The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* 1992; 90: 41–54.
23. Kralik, G., Petričević, A., Levaković, F. (1988.): Slaughter value of pigs of different production types. *Proceedings 34th international congress of meat science and technology*, 29. kolovoza – 2.rujna, Brisbane, 88-90.
24. Li, S. J., Yang, S. H., Zhao, S. H., Fan, B., Yu, M., Wang, H. S., Li, K. (2004.): Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. *Journal of animal science*, 82(2): 368-374.
25. Ligers, A. Teleshova, N. Masterman, T. Huang, W.X., Hillert, J. (2001.): CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.*, 2: 145–152.
26. Margeta, V. (2012.): Genetska analiza crne slavonske svinje. *Poljoprivreda*, 18(2): 69-70
27. Margeta, V., Gvozdanović, K., Galović, D., Grčević, M., Radišić, Ž. (2016.): Proizvodna i klaonička svojstva Crne slavonske svinje u tovu do visokih završnih Literatura 132 tjelesnih težina. 23. Međunarodno savjetovanje KRMIVA 2016,1.-3. Lipanj 2016., Opatija.
28. Marušić, L. (2010.): Proizvodna svojstva svinja crne slavonske pasmine u otvorenom sustavu držanja, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
29. Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998.): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639
30. Michailidou, S., Kalivas, A., Ganopoulos, I., Stea, E., Michailidis, G., Tsaftaris, A., & Argiriou, A. (2014.): A multi-farm assessment of Greek black pig genetic diversity using microsatellite molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 13(2): 2752-2765.
31. Murugaiah, C., Al-Talib, H., Radu, S. (2015.): Forensics: Food Authentication Using MtDNA. *Journal Nutrition Health Food Science*, 3: 1-10.
32. Orrù, L., Napolitano, F., Catillo, G., Moiola, B. (2006.): Meat molecular traceability: How to choose the best set of microsatellites?. *Meat Science*, 72(2): 312-317.
33. Pardo, E., Cavadía T.I., Melendez, I. (2015.): Genetic diversity of domestic pigs in Tierralta (Colombia) using microsatellites. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 28 (3): 272-278.

34. Peakall, R., Smouse P.E. (2012.): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
35. Posavi, M., Ozimec, R., Ernoić M., Poljak F. (2003.): Enciklopedija hrvatskih domaćih životinja, Katarina Zrinski d.o.o., Varaždin.
36. Pejaković, I. (2002.): Uzgoj svinja na otvorenom, Hrvatski zavod za poljoprivrednu savjetodavnu službu, Zagreb.
37. Revidatti, M.A., Delgado Bermejo, J.V., Gama, L.T., Landi Periat, V., Ginja, C., Alvarez, L.A. (2014.). Genetic characterization of local Criollo pig breeds from the Americas using microsatellite markers. *J Anim Sci* 92: 4823–4832.
38. Senčić, Đ., Antunović, Z., Steiner, Z., Rastija, T., Šperanda, M. (2001.): Fenotipske značajke mesnatosti crne slavonske svinje – ugrožene pasmine. *Stočarstvo* 55 (6): 419-425.
39. Senčić, Đ., Antunović, Z., Kanisek, J., Šperanda, M. (2005.): Fattening, meatness and economic efficiency of fattening pigs. *Acta veterinaria* 55 (4): 327-334.
40. Senčić, Đ., Samac, D., Antunović, Z., Novoselec, J., & Klarić, I. (2010.): Utjecaj razine sirovih proteina u krmnim smjesama na kvalitetu polovica i mesa crnih slavonskih svinja. *MESO: prvi hrvatski časopis o mesu*, 12(1): 28-33.
41. Teletchea, F., Bernillon, J., Duffrais, M., Laudet, V., Hänni, C. (2008.): Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*, 45: 967–975.
42. Uremović, M. (1995.): Crna slavonska svinja ulazi u fazu izčezavanja. *Agronomski glasnik*, 57 (4-5): 311-316.
43. Uremović, M., Uremović, Z., Luković, Z. (2000.): Production properties of the Black Slavonian pig breed. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo Zootehnika* 76: 131-134.
44. Uremović, M., Uremović, Z., Luković, Z., & Konjačić, M. (2003): The influence of genotype and production conditions on the fertility of sows in outdoor system. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 68(4), 245-248.
45. Uremović, M., Uremović Z., Luković, Z. (2006.): Utjecaj genotipa i načina hranidbe na rezultate u tovu svinja. *Proceedings of the 41st Croatian & 1st International Symposium on Agriculture, Opatija, 2006*, 667-668
46. Wintero, A. K., Fredholm, M., Thomsen, P.D. (1992.): Variable (dG-DT)_n.(dCdA)_n sequences in the porcine genome. *Genomics* 12, 1026-1031.

Web stranice:

1. Hrvatska Poljoprivredna Agencija (HPA) (2016a.): Svinjogojstvo: Godišnje izvješće za 2016.godinu. Dostupno na: <http://www.hpa.hr/wpcontent/uploads/2014/06/Svinjogojstvo.pdf>
2. Hrvatska Poljoprivredna Agencija (HPA) (2016b.): Brojno stanje domaćih životinja 2016. Dostupno na: <http://www.hpa.hr/brojno-stanje-domacih-zivotinja/>

8. SAŽETAK

Istraživanje je provedeno na 50 svinja crne slavonske pasmine (CS). Cilj ovog istraživanja je utvrditi i analizirati genetsku varijabilnost iz 50 uzoraka crne slavonske pasmine svinja na temelju molekularno- genetskih analiza. Prema ISAG-FAO preporuci za genescan analizu korišten je set sljedećih mikrosatelitnih lokusa: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw9366, S0218, S0228, Sw240, Sw2406, Sw122, Sw857, 0097, Sw72, S0226, Sw911, S0002, Sw1067 i S0101. Prosječan broj alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje iznosio je 7,826. Vrijednost očekivane heterozigotnosti za analizirane mikrosatelitske markere iznosila je 0,685, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,625. Srednja PIC vrijednost iznosila je 0,647 što označava visoko informativne markere. Srednja vrijednost koeficijenta inbridinga iznosila je 0,098. Iz rezultata STRUCTURE analize jasno je uočljivo postojanje pretpostavljena tri genetska klastera. Dobiveni rezultati su u skladu s postavljenom hipotezom da unutar populacije crne slavonske svinje postoji određeni stupanj inbridinga i heterozigotnost lokusa.

9. SUMMARY

The study was conducted on 50 pigs of the Black Slavonian breed (CS). The aim of this study was to determine and analyze genetic variability from 70 samples of Black Slavonian breeds of pigs based on molecular genetic analysis. According to the ISAG-FAO recommendation for genescan analysis, a set of following microsatellite loops was used: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw9366, S0218, S0228, Sw240, Sw2406, Sw122, Sw857, , S0226, Sw911, S0002, Sw1067 and S0101. The average number of alleles for 23 analyzed microsatellite markers within the Black Slavonian pig population was 7.826. The value of the expected heterozygosity for the analyzed microsatellite markers was 0.685, while the average heterozygosity was 0.625. The average PIC value was 0.647, which indicates highly informative markers. The results of the STRUCTURE analysis clearly show the existence of three genetic clusters. The obtained results are in line with the hypothesis that within the populations of black Slavonian pigs there is a certain degree of inbreeding and heterozygous locus.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Mikrosateliti grupirani u tri združene reakcije.....	16
Tablica 2. Broj alela (N), očekivana heterozigotnost (H_{exp}), uočena heterozigotnost (H_{obs}), informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) te Wrightova F statistika za crnu slavonsku pasminu uz set od 23 mikrosatelitska markera.....	18
Tablica 3. Frekvencije alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera.....	20

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Crna slavonska svinja.....	3
Slika 2. Prasci crne slavonske svinje	5
Slika 3. Držanje crnih slavonskih svinja na otvorenom	7
Slika 4. Stupci tijeka rada razvoja SSR markera	10
Slika 5. MtDNK svinja	11
Slika 6. SNP često mijenja oblik i / ili smanjuju funkciju enzima. Rijetko, SNP-ovi mogu poboljšati funkciju enzima (nije prikazano)	12
Slika 7. CarnoCheck sustav detekcije može identificirati 8 različitih vrsta životinja	13
Slika 8. Rezultati STRUCTURE analize uz K=1 do K=5	24
Slika 9. Rezultati STRUCTURE analize uz set od 23 mikrosatelitska markera	25
Slika 10. Vizualizacija rezultata STRUCTURE analize pomoću Clumpak softvera	26

12. POPIS GRAFIKONA

Graf 1. Frekvencija alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje.....	22
Graf 2. Broj genetskih klastera K određen metodom prema Evannu i sur. (2005.).....	23

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Diplomski rad

Sveučilišni diplomski studij, smjer Specijalna zootehnika

ANALIZA GENETSKE VARIJABILNOSTI CRNE SLAVONSKE SVINJE

Aleksandra Mrkalj

Sažetak: Istraživanje je provedeno na 50 svinja crne slavonske pasmine (CS). Cilj ovog istraživanja je utvrditi i analizirati genetsku varijabilnost iz 50 uzoraka crne slavonske pasmine svinja na temelju molekularno-genetskih analiza. Prema ISAG-FAO preporuci za genescan analizu korišten je set sljedećih mikrosatelitnih lokusa: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw9366, S0218, S0228, Sw240, Sw2406, Sw122, Sw857, 0097, Sw72, S0226, Sw911, S0002, Sw1067 i S0101. Prosječan broj alela za 23 analizirana mikrosatelitska markera unutar populacije crne slavonske svinje iznosio je 7,826. Vrijednost očekivane heterozigotnosti za analizirane mikrosatelitske markere iznosila je 0,685, dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,625. Srednja PIC vrijednost iznosila je 0,647 što označava visoko informativne markere. Srednja vrijednost koeficijenta inbridinga iznosila je 0,098. Iz rezultata STRUCTURE analize jasno je uočljivo postojanje pretpostavljena tri genetska klastera. Dobiveni rezultati su u skladu s postavljenom hipotezom da unutar populacije crne slavonske svinje postoji određeni stupanj inbridinga i heterozigotnost lokusa.

Rad je izrađen pri: Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: dr. sc. Kristina Gvozdanović

Broj stranica: 42

Broj grafikona i slika: 2/10

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 47

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: crna slavonska svinja, mikrosateliti, DNK, združena PCR reakcija

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:

doc. dr. sc. Vladimir Margeta, predsjednik

dr.sc. Kristina Gvozdanović, mentor

izv.prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakultet biotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Graduate thesis

University Graduate Studies, Special zootechnique

ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY OF THE BLACK SLAVONIAN PIGS

Aleksandra Mrkalj

Abstract: The study was conducted on 50 pigs of the Black Slavonian breed (CS). The aim of this study was to determine and analyze genetic variability from 50 samples of Black Slavonian breeds of pigs based on molecular genetic analysis. According to the ISAG-FAO recommendation for genescan analysis, a set of following microsatellite loops was used: S0026, S0155, S0005, Sw2410, Sw830, S0355, Sw24, Sw632, Swr1941, Sw9366, S0218, S0228, Sw240, Sw2406, Sw122, Sw857, , S0226, Sw911, S0002, Sw1067 and S0101. The average number of alleles for 23 analyzed microsatellite markers within the Black Slavonian pig population was 7.826. The value of the expected heterozygosity for the analyzed microsatellite markers was 0.685, while the average heterozygosity was 0.625. The average PIC value was 0.647, which indicates highly informative markers. The mean value of the inbreeding coefficient was 0.098. The results of the STRUCTURE analysis clearly show the existence of three genetic clusters. The obtained results are in line with the hypothesis that within the populations of black Slavonian pigs there is a certain degree of inbreeding and heterozygous locus.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: dr. sc. Kristina Gvozdanović

Number of pages: 42

Number of figures: 2/16

Number of tables: 3

Number of references: 47

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: Black Slavonian pig, microsatellites, DNA, multiplex PCR

Thesis defended on date:

1. doc. dr. sc. Vladimir Margeta, president
2. dr. sc. Kristina Gvozdanović, mentor
3. prof. dr. sc. Ivona Djurkin Kušec, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.